

540145

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19)世界知的所有権機関
国際事務局



(43)国際公開日
2004年7月15日 (15.07.2004)

PCT

(10)国際公開番号
WO 2004/058959 A1

(51)国際特許分類⁷: C12N 9/12, C07H 21/02, C12P 19/34,
C12N 15/54, 1/21 // (C12N 9/12, C12R 1:19)

(74)代理人: 清水 尚人 (SHIMIZU,Naoto); 〒601-8550 京都府 京都市 南区吉祥院西ノ庄門口町 14 番地 日本新薬株式会社 知的財産部 Kyoto (JP).

(21)国際出願番号: PCT/JP2003/016653

(81)指定国(国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(22)国際出願日: 2003年12月25日 (25.12.2003)

(84)指定国(広域): ARIPO 特許 (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(25)国際出願の言語: 日本語

添付公開書類:
— 国際調査報告書

(26)国際公開の言語: 日本語

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイドスノート」を参照。

(30)優先権データ:
特願 2002-376780

2002年12月26日 (26.12.2002) JP

(71)出願人(米国を除く全ての指定国について): 日本新薬株式会社 (NIPPON SHINYAKU CO., LTD.) [JP/JP]; 〒601-8550 京都府 京都市 南区吉祥院西ノ庄門口町 14 番地 Kyoto (JP).

(72)発明者; および

(75)発明者/出願人(米国についてのみ): 村井 正俊 (MURAI,Masatoshi) [JP/JP]; 〒659-0033 兵庫県 芦屋市高浜町 7番1-9 11号 Hyogo (JP).

(54) Title: PROCESS FOR PRODUCING PNPase

(54)発明の名称: PNPaseの製造法

WO 2004/058959 A1

(57)Abstract: It is intended to provide a process for producing PNPase whereby PNPase can be highly efficiently and conveniently produced while reducing contamination with endotoxins causing problems in synthesizing a nucleic acid polymer as a medicinal material. PNPase is produced by using *Escherichia coli*, etc. having a T7 RNA polymerase gene which has been transformed by an expression vector carrying a PNPase gene and a T7 promoter ligated together. Moreover, the step of purifying PNPase is simplified by using an expression vector having a tag gene or prolonging the culture time.

(57)要約: 高効率で簡便にPNPaseを製造することができ、また医薬品原料としての核酸重合体の合成において問題となるエンドトキシンの混入を低減できる、PNPaseの製造法を提供することである。PNPase遺伝子とT7プロモーターとを連結する発現ベクターにより、T7 RNAポリメラーゼ遺伝子を有する大腸菌等を形質転換したものを用いることなどにより、PNPaseを製造する。また、PNPaseの精製工程をより簡便にするために、タグ遺伝子を有する発現ベクターを利用したり、培養時間を長くする。

明細書

PNPase の製造法

5 技術分野

本発明は、合成核酸重合体を製造するために有用な酵素である PNPase（ポリヌクレオチドホスホリラーゼ）の製造法に関するものである。

従来の技術

10 PNPase は、1955 年に S.Ochoa により発見された酵素であり、リボヌクレオシド二リン酸の可逆的重合を触媒し、無機リンを放出する酵素である。この酵素は、細菌に広く分布しているが、動物には存在しない。

試験管内でこの酵素を作用させればリボヌクレオシド二リン酸の重合を行うことができるので、高分子量のホモポリマー、コポリマー、または配列の
15 決まったオリゴマーを合成するのに有用である。

PNPase は、古典的には細菌から分離抽出して得ることができるが、組換え DNA 手法により微生物内で大量に製造しうる方法も知られている（米国特許第 4 9 1 2 4 9 6 号）。特許文献 1 では酵素遺伝子の発現量を上昇させるために適当な発現制御シグナルを含むベクターに PNPase 遺伝子（以下、「pnp 遺
20 伝子」ともいう）を組み込み、形質転換した菌体内で PNPase を大量に蓄積させた後、菌体破碎を行い PNPase を抽出精製する方法が示されている。

T7 RNA ポリメラーゼ（Genbank 登録番号 M38308）は、高効率にかつ特異的に T7 プロモーターダー下流の遺伝子の転写を促進する（米国特許第 4 9 1 2 4 9 6 号・米国特許第 5 6 9 3 4 8 9 号・米国特許第 5 8 6 9 3 2 0 号）。

25

発明の開示

本発明は、従来から知られている方法よりも高効率で簡便に PNPase を製造することができ、また医薬品原料としての核酸重合体の合成において問題となるエンドトキシンの混入を低減できる、PNPase の製造法を主として提供

することにある。

本発明者らは、銳意検討した結果、*pnp* 遺伝子と T7 プロモーターとを連結する発現ベクターにより、T7 RNA ポリメラーゼ遺伝子を有する大腸菌等を形質転換したもの用いることなどにより、上記課題を解決することができ、本発明を完成した。

本発明として、例えば、下記のものを挙げることができる。

(1) 少なくとも次の工程を含有する PNPase の製造法。

A. 発現制御シグナルである T7 プロモーターを有するプラスミドに原核生物由来の PNPase 遺伝子を組み込んだ発現ベクターを構築する工程；

B. 当該ベクターを用いて、T7 RNA ポリメラーゼ遺伝子を有する大腸菌又はその類縁菌を形質転換する工程；

C. 当該形質転換体に PNPase 遺伝子を発現させることによって、PNPase を菌体内に蓄積させる工程；

D. PNPase が蓄積された菌体を回収し、PNPase を抽出精製する工程。

または、

(2) 少なくとも次の工程を含有する PNPase の製造法。

A. 発現制御シグナルである T7 プロモーターを有するプラスミドに原核生物由来の PNPase 遺伝子を組み込んだ発現ベクターを構築する工程；

B. 当該ベクターを用いて、T7 RNA ポリメラーゼ遺伝子を有する大腸菌又はその類縁菌を形質転換する工程；

C'. 当該形質転換体に PNPase 遺伝子を発現させることによって、PNPase を菌体内に蓄積させ、さらに菌体が壊れ PNPase が菌体外上清中に滲出するまで発現を続ける工程；

D'. 上清中に滲出した PNPase を回収精製する工程。

この中、上記 (2) の製造法が好ましい。

pnp 遺伝子の起源は特に制限されず、例えば、大腸菌（例、K12 株、O157 株）やその類縁菌（例、*Salmonella typhimurium*）を挙げることができる。本発明においては、特に大腸菌（特に、K12 株）由来の *pnp* 遺伝子が好まし

い。

発現制御シグナルである T 7 プロモーターを有するプラスミドとしては、T 7 プロモーターを有するプラスミドであれば特に制限されないが、菌体内で複製可能であり、特定の制限酵素切断部位を有し、菌体内のコピー数の高い当該プラスミドベクターを用いるのが好ましい。具体例としては、pET 系プラスミド（ノバゲン社製）、pRSET-A、p-RSET-B、pRSET-C（インヴィトロゲン社製）を挙げることができる。

また、当該プラスミドについては、本発明に係る PNPase（以下、当該酵素ともいう）にいわゆるタグを付与することができる、タグ遺伝子を有するものが好ましい。このようなタグ遺伝子としては、例えば、His タグ遺伝子、T7 タグ遺伝子、S タグ遺伝子、Nus タグ遺伝子、GST タグ遺伝子、DsbA タグ遺伝子、DsbC タグ遺伝子、CBD_{cex} タグ遺伝子、CBD_{cenA} タグ遺伝子、CBD_{clos} タグ遺伝子、Trx タグ遺伝子、HSV タグ遺伝子、3 × FLAG タグ遺伝子を挙げができる。特に His タグ遺伝子が適当である。

宿主としての大腸菌又はその類縁菌としては、T7 RNA ポリメラーゼ遺伝子を有するものであれば特に制限されないが、組換え DNA 実験で使用されるものが好ましい。具体例としては、BL21[DE3]大腸菌、BL21[DE3]pLysS 株大腸菌、BLR[DE3]株大腸菌、Rosetta[DE3]株大腸菌、B834[DE3]株大腸菌を挙げができる。

本発明によって製造された当該酵素を用いれば、核酸ホモポリマー、核酸コポリマー、オリゴ核酸など種々の核酸重合体を合成することができる。合成しうる核酸重合体の具体例としては、ポリイノシン酸、ポリシチジル酸、ポリウリジル酸、ポリアデニル酸、ポリグアニル酸、ポリ（5-ブロモシチジル酸）、ポリ（2-チオシチジル酸）、ポリ（7-デアザイノシン酸）、ポリ（2' -アジドイノシン酸）、ポリ（シチジン-5' -チオリン酸）、ポリ（1-ビニルシチジル酸）、ポリ（シチジル酸、ウリジル酸）、ポリ（シチジル酸、4-チオウリジル酸）、ポリ（アデニル酸、ウリジル酸）を挙げができる。

本発明を実施するための操作自体は、全て公知の方法により行うことができる。

I. 工程A～Dについて

工程A：

5 例えば、大腸菌の染色体 DNA から常法により pnp 遺伝子をクローニングすることができる。具体例として、コロニーハイブリダイゼーション法によるクローニングを挙げることができる。

次に、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR 法）により、pnp 遺伝子の開始コドンに NdeI 切断点を導入し、また終止コドン下流に EcoRI 切断点を導入し、常 10 法によりこの NdeI 切断点から、pnp 遺伝子を含んだ EcoRI 切断点までの DNA 断片を得ることができる。

この DNA 断片を、予め NdeI および EcoRI で切断し、5'末端を脱リン酸化した、T 7 プロモーターを有するプラスミドと常法により混合し結合反応を行うことにより、目的とする発現ベクターを構築することができる。

15 工程B：

上記により得られた発現ベクターを用いて、常法により T7 RNA ポリメラーゼ遺伝子を有する大腸菌又はその類縁菌を形質転換することができる。形質転換された大腸菌等は、常法により凍結保存することができる。

形質転換法としては、常法により行うことができ特に限定されない。具体的には、例えば、塩化カルシウム法、エレクトロポレーション法などの方法を挙げることができる。

工程C、C'：

当該形質転換体は、増殖可能な培地で常法により培養増殖することができる。培養増殖に際しては、37°Cで例えば一晩、前培養することが好ましい。

25 そして、本培養を開始して適当な濁度まで到達した後（例えば、600 nm での濁度が 0.4～1.0）、適当な発現誘導剤を適当量添加して pnp 遺伝子を発現させ、当該酵素を菌体内に誘導することができる。当該誘導剤添加後、例えば 7 ～ 9 時間培養を行えば、菌体内への当該酵素の蓄積が通常最大になるが、さらに例えば 24 時間培養を続ければ、通常、菌体が自己消化し当該酵素を培養

上清に滲出させることができる。当該酵素を培養上清に滲出させる方が、菌体破壊過程と抽出過程がないためそれだけ純度の高い当該酵素を得ることができ、またエンドトキシンの混入を低減することができる。

上記発現誘導剤としては、例えばイソプロピル- β -D-チオガラクトピラノシド（以下、IPTG という）、ラクトースを挙げることができる。
5

形質転換体の培養は、炭素源、窒素源などの微生物の増殖に必要な栄養源を含有する培地を用いて常法により行うことができる。当該培地としては、例えば、2×YT 培地、LB 培地、M9CA 培地など通常の大腸菌培養に用いられる培地を用いることができる。培養は、例えば 20~40°C の培養温度で必要により通気、攪拌しながら行うことができる。また、培養中におけるプラスミドの脱落を防ぐために適当な抗生物質（プラスミドの薬剤耐性マーカーに応じて、アンピシリン、カナマイシンなど）を適定量培養液に加えて培養することもできる。その際、培養後期の発泡によるオーバーフローを防ぐために、適当な消泡剤（例えば、アデカノール L G - 1 0 9（旭電化工業社製）、
10
15 AntifoamAF Emulsion（ナカライトスク社製））を適定量添加することもできる。

工程 D、D' :

培養・誘導を終えた菌体を回収し、当該酵素を抽出・精製する方法としては、常法により行うことができる。

20 まず、菌体内に当該酵素が蓄積されている場合には、適当な緩衝液中に菌体を懸濁させ、超音波処理、フレンチプレス処理などの方法により物理的に菌体を破壊し、菌体残渣を除去して当該酵素を得ることができる。精製が必要な場合には、硫酸アンモニウムによる塩析処理、透析処理、エタノールなどの溶媒処理、各種クロマトグラフィー処理、限外濾過などで当該酵素を精
25 製することができる。

長時間の培養・誘導により、当該酵素が培養上清に滲出している場合には、上記のような菌体破壊の工程を省略することができる。

タグ付きで発現した当該酵素の場合には、常法により更に容易に回収精製を行うことができる。例えば、回収した上清を、付与されたタグに適した力

ラムで処理することにより精製することができる。

本発明方法により製造された当該酵素は、医薬品として使用可能なエンドトキシンフリーの核酸重合体を合成するためにエンドトキシン除去カラムで処理することもできる。なお、長時間の培養・誘導により、培養上清に滲出させて当該酵素を製造した場合には、菌体の破壊という工程が不要であるため、エンドトキシンの混入をそれだけ防ぐことができる。

II. 核酸重合体の合成方法

リボヌクレオシドニリン酸に、本発明方法で得られた当該酵素を常法により作用させることにより、核酸重合体を合成することができる。タグが付与されている当該酵素は、そのまま用いることができるが、常法によりタグを外して用いることもできる。

図面の簡単な説明

第1図は、Hisタグを付与したPNPase (His-PNPase) 発現プラスミド pET28a · E.coli · His-PNPase のプラスミドマップを示す。

第2図は、Hisタグを付与しないPNPase(native-PNPase) 発現プラスミド pET30a · E.coli · native-PNPase のプラスミドマップを示す。

第3図は、Hisタグを付与したPNPaseの活性を示す。縦軸はPNPaseの活性 (U/L培養液) を、横軸は発現誘導後の培養時間 (時間) を、それぞれ示す。また、黒いカラムは菌体破碎液中のPNPase活性を、白いカラムは培養上清中のPNPase活性を示す。

第4図は、Hisタグを付与していないPNPaseの活性を示す。縦軸はPNPaseの活性 (U/L培養液) を、横軸は発現誘導後の培養時間 (時間) を、それぞれ示す。また、黒いカラムは菌体破碎液中のPNPase活性を、白いカラムは培養上清中のPNPase活性を示す。

第5図は、ポリイノシン酸の合成反応収率と平均鎖長を示す。左縦軸は合成反応収率 (%) を、右縦軸は平均鎖長 (塩基数) を、横軸は時間(時間) をそれぞれ表す。—●—は合成反応収率の推移を、---○---は平均鎖長の推移をそれぞれ表す。

第6図は、ポリシチジル酸の合成反応収率と平均鎖長を示す。左縦軸は合成反応収率(%)を、右縦軸は平均鎖長(塩基数)を、横軸は時間(時間)をそれぞれ表す。—●—は合成反応収率の推移を、---○---は平均鎖長の推移をそれぞれ表す。

5

発明を実施するための最良の形態

以下、実施例、試験例により本発明を更に詳述する。但し、本発明が下記実施例に限定されることは言うまでもない。

実施例1

10 (1) pnp 遺伝子を組み込んだ発現ベクターの構築

大腸菌 C600K 株の染色体 DNA からコロニーハイブリダイゼーション法により pnp 遺伝子をクローニングし、PCR 法により、pnp 遺伝子の開始コドンに NdeI 切断点を導入し、また終止コドン下流に EcoRI 切断点を導入し、常法によりこの NdeI 切断点から、pnp 遺伝子を含んだ EcoRI 切断点までの DNA
15 断片を得た。

この DNA 断片を、予め NdeI および EcoRI で切断し、5'末端を脱リン酸化した発現ベクタープラスミド pET28a (His タグ遺伝子を含む。ノバゲン社製) と混合し結合反応を行い、タグ遺伝子を有する発現ベクターを構築した。

この発現ベクターは、約 2400 塩基対の DNA 断片が挿入された
20 pET28aDNA で構成され、このプラスミドを pET28a · E.coli · His · PNPase と命名した (図 1 参照)。ベクター由来の一部分を含めて、pnp 遺伝子の全 DNA 配列を解読した結果、ベクター由来部分はノバゲン社が発表している配列と一致し、pnp 遺伝子部分は公的遺伝子データベース Genbank 登録番号 NC000913 に記載されている大腸菌 K12 株の pnp 遺伝子相当部分の DNA 配
25 列と完全に一致した。

また、pET28a · E.coli · His · PNPase DNA を NdeI および EcoRI で切断し、アガロースゲル電気泳動を行い、約 2400 塩基対の NdeI-EcoRI DNA 断片を抽出した。次にこの DNA 断片を、予め NdeI および EcoRI で切断し、5'末端を脱リン酸化した発現ベクタープラスミド pET30a (タグ遺伝子を含まない。

ノバゲン社製)と混合し結合反応を行い、タグ遺伝子を有しない発現ベクターを構築した。

この発現ベクターは、約 2400 塩基対の DNA 断片が挿入された pET30a DNA で構成され、このプラスミドを pET30a · E.coli · native · PNPase と命名した(図 2 参照)。

(2) 形質転換体の調製

上記プラスミド pET28a · E.coli · His · PNPase ないし pET30a · E.coli · native · PNPase を用いて、大腸菌 BL21[DE3]株(ノバゲン社製)を常法により形質転換して、各々の形質転換体を調製した。

10 (3) 当該酵素の産出

pET28a · E.coli · His · PNPase を含む大腸菌 BL21[DE3]株の形質転換体ないし pET30a · E.coli · native · PNPase を含む大腸菌 BL21[DE3]株の形質転換体を、カナマイシンを添加した変法 terrific broth 培地(24 g/L 酵母エキス(ナカライトスク社製)、12 g/L トリプトン(ナカライトスク社製)、0.4%[v/v] グリセロール)中で 37°C、約 16 時間往復振盪培養(MR-200L 振盪培養機、高崎科学社製)し、前培養した。

15 10 L 容卓上型ジャーファーメンター(オリエンタル酵母社製、LS-10)に LB 培地(LB BROTH BASE、インビトロゲン社製、cat No. 12780-052)を仕込み、前培養液を植菌し(培養開始時点での 600 nm での濁度は約 0.2)、
20 37 °C、1 vvm、500 rpm で通気培養を行った。600 nm での濁度が 0.5~0.7 に達した時、IPTG(ナカライトスク社製)を 0.4 mM となるよう添加し、発現誘導を行うことにより 2 つの当該酵素をそれぞれ産出した。

25 なお、発現ベクターの脱落を阻止するため、カナマイシンを 25 mg/L となるよう添加した。消泡剤としてアデカノール LG-109(旭電化工業社製)を、培地 7 L 当たり約 0.2 mL 添加した。

(4) 回収、抽出、精製

①まず、IPTG 添加による発現誘導 3 時間後の培養液 112 L(7 L 培養 × 16 回)から集めた菌体より、His タグを付与された当該酵素の精製を行った。

菌体を培養液量の約 1/60 量の抽出用緩衝液 A(20 mM Tris-HCl pH8.0、

0.5 M 塩化ナトリウム、10% グリセロール) に懸濁し、50 mg/L となるよう卵白リゾチームを加え、室温で 30 分振盪した後、−80 °C で凍結した。37 °C で凍結菌体を急速に融解した後、アストラソン社製超音波細胞破碎機 XL2020 および cat No.200 の破碎ホーンを用いて、最大出力にて約 5 分間超音波破碎した。菌体破碎液を 20,000×g、4 °C、60 分間遠心し、上清を採取し、1.6 L の菌体粗抽出液を調製した。菌体粗抽出液を Ni⁺親和性クロマトグラフ (φ 2.6 × 20、His Bind Flactogel M、ノバゲン社製) にかけ、His タグが付与された当該酵素を精製した。菌体粗抽出液を抽出用緩衝液 A で平衡化したカラムに 5 mL/min にアプライした後、樹脂を 1 L の抽出用緩衝液 A で洗浄し、最後に 1 L の 0.5 M イミダゾールを含む抽出用緩衝液 A で His タグが付与された当該酵素をカラムから溶出した。次に、pH の変更、塩化ナトリウムおよびイミダゾールを除去する目的で、限外濾過膜を用いたダイアフィルトレーションを行った。当該酵素を含む 1 L の溶出液を、限外濾過カートリッジ (PREP/SCALE-TFF、分画分子量 : 10,000、ミリポア社製) を用いて約 600 mL まで濃縮し、次に液量を一定に保つように緩衝液 (50 mM Tris-HCl pH7.0、0.15 M 塩化ナトリウム、5 % グリセロール) を添加しながら限外濾過を行った。濾液が 7 L に達するまで限外濾過を続け、当該酵素溶液の緩衝液組成を変更した。次にこの酵素液をエンドトキシン除去カラム (Kurimover II、φ 2.6 × 10 cm、栗田工業社製) にかけた。酵素液を 1.7 mL/min で活性化した Kurimover II カラムに通し、通過画分を集めた。次に、pH の変更、塩化ナトリウムを除去する目的で、限外濾過カートリッジを用いたダイアフィルトレーションを行った。酵素液の液量を一定に保つように緩衝液 (20 mM Tris-HCl pH8.0、5 % グリセロール) を添加しながら、限外濾過を行った。濾液が 7 L に達するまで限外濾過を続け、当該酵素溶液の緩衝液組成を変更した後、−20 °C で凍結保存した。精製の各工程で試料を採取し、当該酵素の活性測定とエンドトキシン量の測定を行った。

その結果を表 1 に示す。

表 1

	PNPase				エンドトキシン 濃度 (EU/mL)	エンドトキシン/ PNPase (EU/U)
	活性 (U/mL)	容積 (mL)	総活性 (U)	収率 (%)		
粗抽出液	553	1,600	885,520	100	ND	ND
Ni ⁺ アフィニティカラム溶出液	520	1,000	520,378	59	ND	ND
1回目デイアフィルトレーション	365	1,000	364,825	41	626,345	1,717
Kurimover II カラム溶出液	239	950	227,124	26	868	3.6
2回目デイアフィルトレーション	248	800	198,714	22	2,299	9.3

ND : 測定せず

表 1 から明らかなように、112 L 培養菌体（誘導後 3 時間培養）から約 20 万ユニットの当該酵素を得ることができた。また、1 回目のダイアフィルトレーション後に多量に含まれていたエンドトキシンは、KurimoverII カラム 5 処理によりほとんど除去され、最終産物には PNPase 1 ユニット当たり、9.3 EU のエンドトキシンが含まれるのみであった。

②次に、IPTG 添加による発現誘導 7 時間後の培養液 56 L (7 L 培養 × 8 回) から集めた菌体より、His タグが付与された当該酵素の精製を行った。菌体を 培養液量の約 1/30 量の抽出用緩衝液 B (20 mM Tris-HCl pH8.0、0.5 M 塩 10 化ナトリウム、5 % グリセロール) に懸濁し、50 mg/L となるよう卵白リゾチームを加え、室温で 30 分間振盪した後、-80°C で凍結した。37°C で凍結菌 15 体を急速に融解した後、アストラソン社製超音波細胞破碎機 XL2020 および cat No.200 の破碎ホーンを用いて、最大出力にて約 5 分間超音波破碎した。

菌体破碎液を 20,000×g、4°C、60 分間遠心し、上清を採取し、1.5 L の菌体 20 粗抽出液を調製した。菌体粗抽出液を Ni⁺親和性クロマトグラフにかけ、His タグが付与された当該酵素を精製した。菌体粗抽出液を抽出用緩衝液 B で平 衡化したカラムに 5 mL/min にアプライした後、樹脂を 1 L の抽出用緩衝液 B で洗浄し、最後に 1 L の 0.5 M イミダゾールを含む抽出用緩衝液 B で His タグが付与されたタンパク質をカラムから溶出した。次に、pH の変更、塩化ナ 25 トリウムおよびイミダゾールを除去する目的で、限外濾過膜を用いたダイア フィルトレーションを行った。当該酵素を含む 1 L の溶出液を、限外濾過カ 一トリッジを用いて約 600 mL まで濃縮し、次に液量を一定に保つように緩 衡液 (50 mM Tris-HCl pH7.0、0.15 M 塩化ナトリウム、5 mM 塩化マグネ

シウム、5 % グリセロール) を添加しながら限外濾過を行った。濾液が 7 L に達するまで限外濾過を続け、当該酵素溶液の緩衝液組成を変更した。次にこの酵素液を Kurimover II カラムにかけた。活性化した Kurimover II カラムに酵素液を 1.7 mL/min で処理し、通過画分を集めた。次に、pH の変更、
 5 塩化ナトリウムを除去する目的で、限外濾過カートリッジを用いたダイアフィルトレーションを行った。酵素液の液量を一定に保つように緩衝液 (20 mM Tris-HCl pH8.0、5 mM 塩化マグネシウム、5 % グリセロール) を添加しながら、限外濾過を行った。濾液が 7 L に達するまで限外濾過を続け、当該酵素溶液の緩衝液組成を変更した後、-20°Cで凍結保存した。精製の各工程で
 10 試料を採取し、当該酵素の活性測定とエンドトキシン量の測定を行った。
 その結果を表 2 に示す。

表 2

	PNPase				エンドトキシン濃度 (EU/mL)	エンドトキシン/ PNPase (EU/U)
	活性 (U/mL)	容積 (mL)	総活性 (U)	収率 (%)		
粗抽出液	615	1,500	921,808	100	ND	ND
Ni+アフィニティカラム溶出液	301	1,100	330,740	36	ND	ND
1回目デイアフィルトレーション	288	1,100	253,377	34	156,387	543
Kurimover II カラム溶出液	230	1,100	227,124	27	8,180	35.5
2回目デイアフィルトレーション	213	800	170,771	19	207	1

ND : 測定せず

表 2 から明らかなように、56 L 培養菌体（誘導後 7 時間培養）から約 17 万ユニットの当該酵素を得ることができた。これは、誘導後 3 時間培養 112 L 菌体から精製した当該酵素量とほぼ同じであり、培養時間を延長することで当該酵素収量を増大させることを証明した結果となった。また、1 回目のダイアフィルトレーション後に多量に含まれていたエンドトキシンは、KurimoverII カラム処理によりほとんど除去され、最終産物には当該酵素 1 ユニット当たり、1.0 EU のエンドトキシンが含まれるのみであった。この数値は、誘導後 3 時間培養 112 L 菌体から精製した当該酵素に含まれるエンドトキシン量 (9.3 EU/U-PNPase) を下回っていた。

③次に、IPTG 添加による発現誘導 24 時間後の培養液 28 L (7 L 培養×4 回) から集めた培養上清より、His タグが付与された当該酵素の精製を行った。培養上清を、150 mL/min の速度で、予め 20 mM Tris-HCl pH8.0 で平衡化した陰イオン交換カラム (QAE·TOYOPERL 550C、Φ 140×70 mm) にかけた。

5 カラムを 5 L の 20 mM Tris-HCl pH8.0、0.1M 塩化ナトリウムを含む緩衝液で洗浄した後、イオン交換樹脂に吸着した当該酵素を 5 L の 20 mM Tris-HCl pH8.0、0.5M 塩化ナトリウムを含む緩衝液で溶出し粗酵素液を得た。粗酵素液を Ni⁺親和性クロマトグラフにかけ、His タグが付与された当該酵素を精製した。粗酵素液を抽出用緩衝液 B で平衡化したカラムに 5 mL/min にアブライした後、樹脂を 1 L の抽出用緩衝液 B、および 1 L の 50 mM イミダゾールを含む抽出用緩衝液 B で洗浄し、最後に 0.5 L の 0.5 M イミダゾールを含む抽出用緩衝液 B で His タグが付与された当該酵素をカラムから溶出した。次に、pH の変更、塩化ナトリウムおよびイミダゾールを除去する目的で、限外濾過膜を用いたダイアフィルトレーションを行った。当該酵素を含む 1 L の

10 溶出液を、限外濾過カートリッジ (PREP/SCALE-TFF、分画分子量 : 30,000、ミリポア社製) を用いて約 500 mL まで濃縮し、次に液量を一定に保つように緩衝液 (50 mM Tris-HCl pH7.0、0.15 M 塩化ナトリウム) を添加しながら限外濾過を行った。濾液が 7 L に達するまで限外濾過を続け、当該酵素溶液の緩衝液組成を変更した。次にこの酵素液を Kurimover II カラムにかけた。

15 活性化した Kurimover II カラムに酵素液を 1.7 mL/min で処理し、通過画分を集めた。次に、pH の変更、塩化ナトリウムを除去する目的で、限外濾過膜 (PREP/SCALE-TFF、分画分子量 : 30,000、ミリポア社製) を用いたダイアフィルトレーションを行った。酵素液の液量を一定に保つように緩衝液 (20 mM Tris-HCl pH8.0、5 mM 塩化マグネシウム、5 % グリセロール) を添加しながら、限外濾過を行った。濾液が 7 L に達するまで限外濾過を続け、当該酵素溶液の緩衝液組成を変更した後、-20°C で凍結保存した。精製の各工程で試料を採取し、当該酵素の活性測定とエンドトキシン量の測定を行った。

20 その結果を表 3 に示す。

表 3

	PNPase				エンドトキシン 濃度 (EU/mL)	エンドトキシン/ PNPase (EU/U)
	活性 (U/mL)	容積 (mL)	総活性 (U)	收率 (%)		
粗抽出液	23.9	28,000	669,698	100	ND	ND
陰イオン交換カラム溶出液	70.4	5,000	352,029	53	ND	ND
Ni+アフィニティカラム溶出液	158	500	79,057	12	7,811,004	49,437
1回目デイアフィルトレーション	135	500	67,500	10	ND	ND
Kurimover II カラム溶出液	111	500	55,300	8	22	0.2
2回目デイアフィルトレーション	87.5	500	43,742	7	105	1.2

ND : 測定せず

表 3 から明らかなように、28 L 培養上清（誘導後 24 時間培養）から約 5 万ユーニットの当該酵素を得ることができた。本酵素は、SDS-PAGE/クマシブルー染色によるタンパク質純度検定において、他のタンパク質の存在をほとんど認めなかつた。また、1 回目のダイアフィルトレーション後に多量に含まれていたエンドトキシンは、KurimoverII カラム処理によりほとんど除去され、最終産物には当該酵素 1 ユニット当たり、1.2 EU のエンドトキシンが含まれるのみであった。この数値は、誘導後 3 時間培養 112 L 菌体から精製した当該酵素に含まれるエンドトキシン量 (9.3 EU/U·PNPase) を下回っていた。このことから、培養上清からの当該酵素精製は、菌体破碎というスケールアップが困難な過程を省略することができ、かつ純度の高い当該酵素を得る方法であると言うことができる。

試験例 1 当該酵素の活性測定

発現誘導後 (IPTG 添加後)、0、1、2、3、5、7、9、24 時間に試料の採取を行い、当該酵素の活性を測定した。

その結果、図 3 および図 4 に示す通り、His タグが付与された当該酵素およびタグが付与されていない当該酵素とともに、誘導後 7~9 時間で菌体内への蓄積が最大となり、24 時間後には減少していた。誘導後 24 時間では、誘導後 7~9 時間で菌体内へ蓄積した量を上回る量の当該酵素が培養上清中に放出されていた (図 3、図 4 参照)。

①当該酵素の活性測定用の試料調製

500mL の遠心管に 400 mL の培養液を採取し、5,000×g、室温、5 分の遠

心分離（日立工機社製 SCR-20BA）により菌体を回収した。上澄みは培養上清として保存した。菌体を 30 mL の 50 mg/L 卵白リゾチームを含む緩衝液（20 mM Tris-HCl pH8.0、0.15 M 塩化ナトリウム、10%[v/v]グリセロール、1 mM Tris-carboxyethylphosphine HCl）に懸濁し、室温で 15 分間放置した
5 後、-80°C 保存した。凍結／融解を 2 回繰り返し、大腸菌を穏和に破碎した後、アストラソン社製超音波細胞破碎機 XL2020 および cat No.200 の破碎ホーンを用いて、最大出力にて約 30 秒間超音波破碎した。菌体破碎液を 10,000 ×g、4°C、10 分間遠心し、上清を採取し、菌体粗抽出液を調製した。

②当該酵素の活性測定

10 1.5 mL 容遠心チューブ（エッペンドルフ社製）に 20 μL の酵素液と 80 μL の当該酵素反応液（125 mM Tris-HCl pH9.0、0.25 mg/mL 牛血清アルブミン、0.5 mM EDTA ニナトリウム、6 mM 塩化マグネシウム、25 mM アデノシン二リン酸三ナトリウム塩）を加えて穏やかに混合し、37 °C で 15 分間保温した。0.9 mL の氷冷した 4 % 過塩素酸ナトリウム水溶液を加えて反応を止めた後、氷上で 10 分間放置した。4 °C、15,000 rpm、5 分間（トミー精工社製、MR-150）の遠心により、上清を分離した。次に、反応上清中に遊離した無機リン酸を定量するために、96 穴プレート（コーニング社製）に 50 μL の上清と 50 μL の Tassky-Shorr 試薬（0.5 M 硫酸、10 g/L モリブデン酸アンモニウム、50 g/L 硫酸第一鉄）を加えて 30 秒間攪拌した後、室温で 5 分間
15 放置した。660 nm の吸光度を測定し（Model 550、Bio-Rad 社製）、当該酵素の活性を算出した。ここで定義する 1U とは、37 °C、pH9.0、15 分間の反応により 1 μ mole の無機リン酸を遊離させる酵素量である。

実施例 2 ポリイノシン酸の合成

112 L 培養菌体から精製した当該酵素を用いて、ポリイノシン酸（RNA エモポリマー）の合成を行った。予め、小スケールの合成反応を行い、反応収率が高く平均鎖長の長いポリマーが合成できる条件を決定した。ポリイノシン酸の合成は、総容量 350 mL、反応液組成（100 mM 2-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethanesulfonic acid (HEPES)-NaOH pH7.5、0.4 mM EDTA ニナトリウム、50 mM 塩化マグネシウム、0.1 g/L イ

ノシンニリン酸三ナトリウム塩(ヤマサ醤油社製)、11.43 U/mL His-PNPase)、37 °Cで行った。経時的に試料を採取し、その一部を変性条件下(7 M 尿素存在下)でのゲル濾過HPLCで分析し、平均鎖長と反応収率を計算した。

鎖長は、pUC119(宝酒造社製)の制限酵素EcoRI、NarIおよびNspI(New England Bio Lab社製)による分解物を指標として決定した。

その結果を図5に示す。図5から明らかなように、37 °C、11時間の反応により、反応収率約50 %で平均鎖長が約2200塩基のポリイノシン酸が得られた。

実施例3 ポリシチジル酸の合成

同様にしてポリシチジル酸の合成を行った。総容量350 mL、反応液組成(100 mM glycine-NaOH pH9.0、0.4 mM EDTA二ナトリウム、25 mM 塩化マグネシウム、0.1 g/L シチジンニリン酸三ナトリウム塩(ヤマサ醤油社製)、11.43 U/mL His-PNPase)、37 °Cで行った。経時的に試料を採取し、その一部を変性条件下でのゲル濾過HPLCで分析し、平均鎖長と反応収率を計算した。

その結果を図6に示す。図6から明らかなように、37 °C、7時間の反応により、反応収率約65 %で平均鎖長が約2200塩基のポリシチジル酸が得られた。

産業上の利用可能性

本発明ではタグを付けた当該酵素を発現させることにより精製が非常に簡便になり、また大腸菌の当該酵素生産量が2倍程度増加するという予想外の効果が得られた。また、培養法の工夫により、当該酵素が菌体内に蓄積せず培養上清中に放出されるようになり、菌体破碎による大量のエンドトキシンの混入を防ぐことができるなど、大量培養からでも迅速かつ簡便に当該酵素を精製できる。

請求の範囲

1. 少なくとも次の工程を含有する PNPase の製造法。

(A) 発現制御シグナルである T7 プロモーターを有するプラスミドに原

5 核生物由来の PNPase 遺伝子を組み込んだ発現ベクターを構築する工程；

(B) 当該発現ベクターを用いて、T7 RNA ポリメラーゼ遺伝子を有する大腸菌又はその類縁菌を形質転換する工程；

(C) 当該形質転換体に PNPase 遺伝子を発現させることによって、PNPase を菌体内に蓄積させる工程；

10 (D) PNPase が蓄積された菌体を回収し、PNPase を抽出精製する工程

。
2. 上記 C) D) の工程が、各々下記 C') D') の工程である、請求項 1 記載の製造法。

(C') 当該形質転換体に PNPase 遺伝子を発現させることによって、PNPase を菌体内に蓄積させ、さらに菌体が壊れ PNPase が菌体外上清中に滲出するまで発現を続ける工程；

(D') 上清中に滲出した PNPase を回収精製する工程。

3. 当該プラスミドが、製造される PNPase にタグを付与することができるタグ遺伝子を有するものである請求項 1 または 2 記載の製造法。

20 4. タグ遺伝子が、His タグ遺伝子、T7 タグ遺伝子、S タグ遺伝子、Nus タグ遺伝子、GST タグ遺伝子、DsbA タグ遺伝子、DsbC タグ遺伝子、CBD_{cex} タグ遺伝子、CBD_{cenA} タグ遺伝子、CBD_{clos} タグ遺伝子、Trx タグ遺伝子、HSV タグ遺伝子、又は 3 × FLAG タグ遺伝子である請求項 3 記載の製造法。

5. 原核生物が、大腸菌である請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載の製造法。

25 6. 大腸菌が、K12 株大腸菌、又は O157 株大腸菌である請求項 5 記載の製造法。

7. T7 RNA ポリメラーゼ遺伝子を有する大腸菌が、BL21[DE3] 株大腸菌、BL21[DE3]pLysS 株大腸菌、BLR[DE3] 株大腸菌、Rosetta[DE3] 株大腸菌、又は B834[DE3] 株大腸菌である請求項 1 ~ 6 記載の製造法。

8. 請求項 1～7 のいずれかに記載の製造法により製造された PNase を用いて製造された合成核酸重合体。
9. 合成核酸重合体が、ポリイノシン酸、ポリシチジル酸、ポリウリジル酸、ポリアデニル酸、ポリグアニル酸、ポリ（5-ブロモシチジル酸）、ポリ（2-チオシチジル酸）、ポリ（7-デアザイノシン酸）、ポリ（2'-アジドイノシン酸）、ポリ（シチジン-5'-チオリン酸）、ポリ（1-ビニルシチジル酸）、ポリ（シチジル酸、ウリジル酸）、ポリ（シチジル酸、4-チオウリジル酸）、又はポリ（アデニル酸、ウリジル酸）である請求項 8 記載の合成核酸重合体。
5

図 1

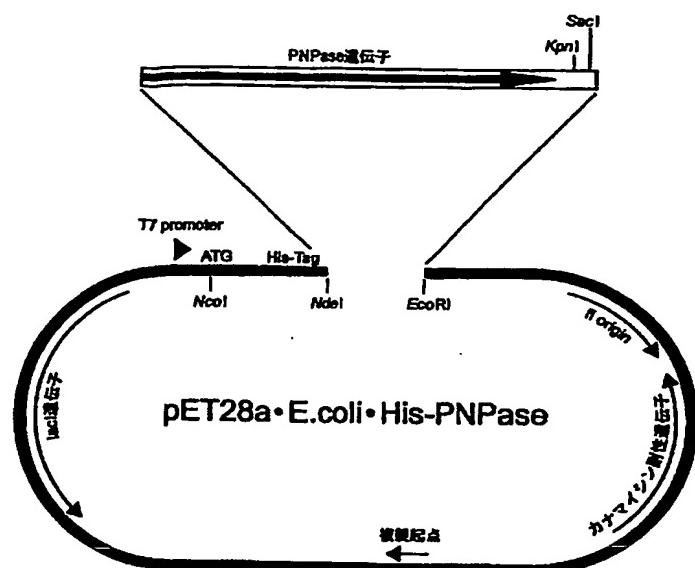


図 2

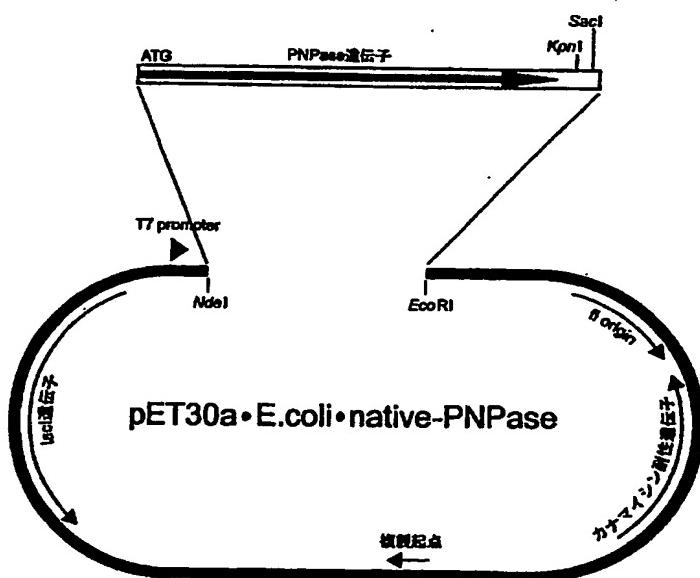


図 3

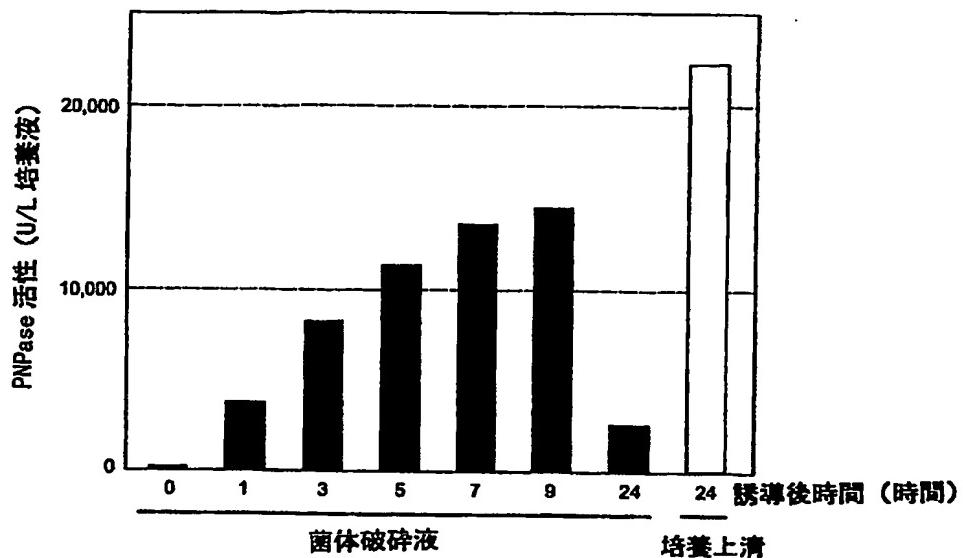


図 4

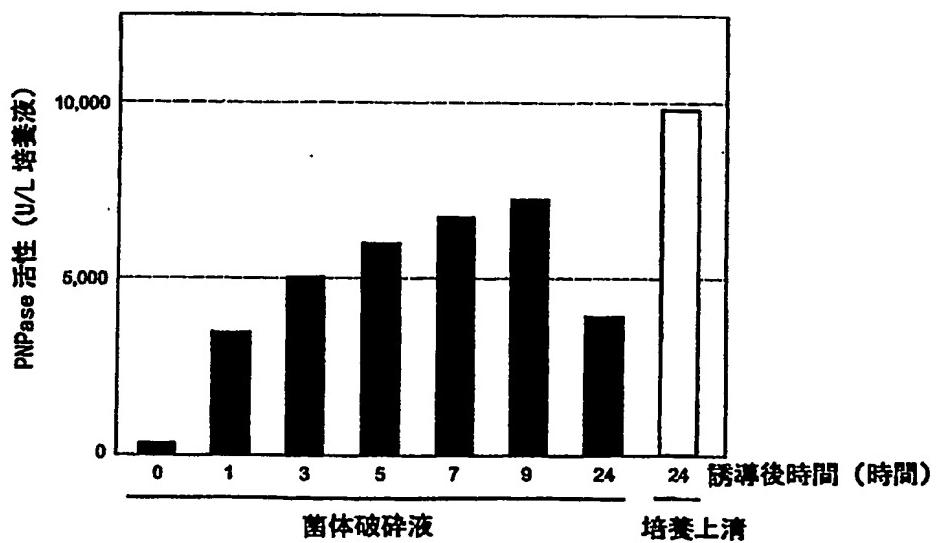


図 5

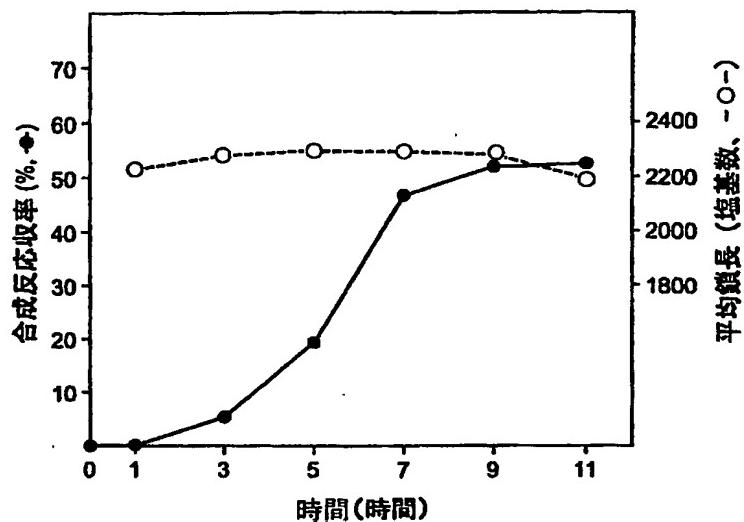
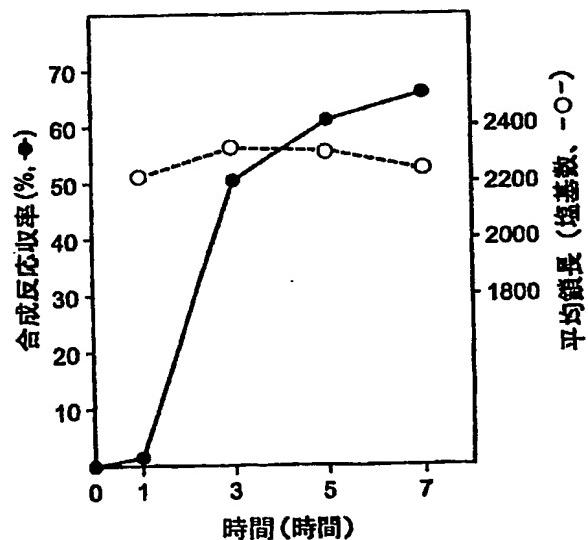


図 6



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/16653

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl' C12N9/12, C07H21/02, C12P19/34, C12N15/54, C12N1/21//
(C12NP/12, C12R1:19)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl' C12N9/12, C07H21/02, C12P19/34, C12N15/54, C12N1/21,
C12R1:19

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
BIOSIS/WPI (DIALOG), JSTPlus (JOIS), PubMed

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/A	JP 53-110697 A (Mitsubishi Chemical Industries Ltd.), 27 September, 1978 (27.09.78), Full text (Family: none)	8-9/1-7
X/A	US 4927755 A (SOCIETE DE CONSEILS DE RECHERCHES ET D'APPLICATIOS SCIENTIFIQUES), 22 May, 1990 (22.05.90), Full text & DE 3837203 A & FR 2622451 A & FR 2622586 A & GB 2211847 A & JP 1-148196 A	8-9/1-7

Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means. "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
--	--

Date of the actual completion of the international search
18 February, 2004 (18.02.04)

Date of mailing of the international search report
02 March, 2004 (02.03.04)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/16653

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/A	EP 1153931 A1 (NIPPON SHINYAKU CO., LTD.), 14 November, 2001 (14.11.01), Full text & WO 00/47601 A1 & JP 2000-598518 A	8-9/1-7
Y	REGNIER P. et al., Nucleotide sequence of the pnp gene of Escherichia coli encoding polynucleotide phosphorylase. Homology of the primary structure of the protein with the RNA-binding domain of ribosomal protein S1., J.Biol.Chem., 1987, 262(1), p.63-8 & Database GenBank accession No.J02638, 20 December, 1995 (20.12.95), REGNIER P. et al., E. coli rpsO and pnp genes encoding ribosomal proteinS15 and polynucleotide phosphorylase, complete cds. & Database PIR accession No.H65106, 01 March, 2002 (01.03.02), REGNIER P. et al., polyribonucleotide nucleotidyltransferase (EC 2.7.7.8) alpha chain - Escherichia coli (strain K-12).	1-9
Y	Database GenBank accession No.AP002564, 07 March, 2001 (07.03.01), ONISHI M. et al., Escherichia coli O157:H7 DNA, complete genome, section 15/20.	1-9
Y	CROFTON S. et al., Cloning and orientation of the gene encoding polynucleotide phosphorylase in Escherichia coli., J.Bacterial., 1983, 154(1), pages 58 to 64	1-9
Y	EP 1221478 A2 (NATIONAL FOOD RESEARCH INSTITUTE, et al.), 10 July, 2002 (10.07.02), Full text & US 2002/0127677 A1 & US 2002/0160480 A1 & JP 2002-281986 A	1-9
Y	WO 98/36080 A1 (THE DOW CHEMICAL CO.), 20 August, 1998 (20.08.98), Full text & EP 970224 A1 & JP 2001-512317 A	1-9
Y	WO 99/57153 A1 (INSIGHT STRATEGY & MARKETING LTD.), 11 November, 1999 (11.11.99), Full text & US 6177545 B1 & US 6531129 B2 & US 2002/0004585 A1 & US 2002/0102619 A1 & US 2002/0114801 A1 & EP 1073682 A1 & JP 2002-512533 A	1-9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/16653

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	EP 972836 A2 (THE INSTITUTE OF PHYSICAL & CHEMICAL RESEARCH), 19 January, 2000 (19.01.00), Full text & US 6280942 B1 & US 6528296 B1 & JP 2000-41686 A	1-9
Y	JP 9-23886 A (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.), 28 January, 1997 (28.01.97), Full text (Family: none)	2
Y	WO 02/10370 A1 (Takeda Chemical Industries, Ltd.), 07 February, 2002 (07.02.02), Full text & JP 2002-253270 A & EP 1306430 A1	2
Y	JP 2001-245666 A (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.), 11 September, 2001 (11.09.01), Full text (Family: none)	2

A. 発明の属する分野の分類(国際特許分類(IPC))

Int. Cl' C12N9/12, C07H21/02, C12P19/34, C12N15/54, C12N1/21 // (C12N9/12, C12R1:19)

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料(国際特許分類(IPC))

Int. Cl' C12N9/12, C07H21/02, C12P19/34, C12N15/54, C12N1/21, C12R1:19

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース(データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS/WPI(DIALOG)

JSTplus(JOIS)

PubMed

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X/A	JP 53-110697 A(三菱化成工業株式会社) 1978.09.27 全文(ファミリーなし)	8-9/1-7
X/A	US 4927755 A(SOCIETE DE CONSEILS DE RECHERCHES ET D'APPLICATIOS SCIENTIFIQUES) 1990.05.22 全文 & DE 3837203 A & FR 2622451 A & FR 2622586 A & GB 2211847 A & JP 1-148196 A	8-9/1-7
X/A	EP 1153931 A1(NIPPON SHINYAKU CO., LTD.) 2001.11.14 全文 & WO 00/47601 A1 & JP 2000-598518 A	8-9/1-7

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献(理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

18.02.2004

国際調査報告の発送日

02.3.2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官(権限のある職員)

上條 肇

4B 3131

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C(続き) .	関連すると認められる文献	関連する 請求の範囲の番号
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	
Y	REGNIER P. et al., Nucleotide sequence of the pnp gene of Escherichia coli encoding polynucleotide phosphorylase. Homology of the primary structure of the protein with the RNA-binding domain of ribosomal protein S1. J. Biol. Chem., 1987, 262(1), p. 63-8 & Database GenBank accession No. J02638, December 20, 1995, REGNIER P. et al., E. coli rpsO and pnp genes encoding ribosomal protein S15 and polynucleotide phosphorylase, complete cds. & Database PIR accession No. H65106, March 01, 2002, REGNIER P. et al., polyribonucleotide nucleotidyltransferase (EC 2.7.7.8) alpha chain - Escherichia coli (strain K-12).	1-9
Y	Database GenBank accession No. AP002564, March 07, 2001, OHNISHI M. et al., Escherichia coli O157:H7 DNA, complete genome, section 15/20.	1-9
Y	CROFTON S. et al., Cloning and orientation of the gene encoding polynucleotide phosphorylase in Escherichia coli. J. Bacteriol., 1983, 154(1), p. 58-64	1-9
Y	EP 1221478 A2 (NATIONAL FOOD RESEARCH INSTITUTE, 他1名) 2002.07.10, 全文 & US 2002/0127677 A1 & US 2002/0160480 A1 & JP 2002-281986 A	1-9
Y	WO 98/36080 A1 (THE DOW CHEMICAL COMPANY) 1998.08.20 全文 & EP 970224 A1 & JP 2001-512317 A	1-9
Y	WO 99/57153 A1 (INSIGHT STRATEGY & MARKETING LTD.) 1999.11.11 全文 & US 6177545 B1 & US 6531129 B2 & US 2002/0004585 A1 & US 2002/0102619 A1 & US 2002/0114801 A1 & EP 1073682 A1 & JP 2002-512533 A	1-9
Y	EP 972836 A2 (THE INSTITUTE OF PHYSICAL & CHEMICAL RESEARCH) 2000.01.19, 全文 & US 6280942 B1 & US 6528296 B1 & JP 2000-41686 A	1-9
Y	JP 9-23886 A (和光純薬株式会社) 1997.01.28 全文(ファミリーなし)	2
Y	WO 02/10370 A1 (武田薬品工業株式会社) 2002.02.07 全文 & JP 2002-253270 A & EP 1306430 A1	2
Y	JP 2001-245666 A (協和醣酵工業株式会社) 2001.09.11 全文(ファミリーなし)	2